



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1527261** **A1**

(5D) 4 C 12 N 9/74

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4395204/31-13

(22) 21.03.88

(46) 07.12.89. Бюл. № 45

(71) Институт химической и биологической физики АН ЭССР и Институт биологической химии АН УССР

(72) М.Э.Хага, А.А.Лавижаар, М.М.Раба, С.А. Пояркова, Л.П.Швачко и В.К. Кибирев

(53) 663.65(088.8)

(56) Hatton M.W.C., Regoezi E. The affinity of human, rabbit and bovine thrombin for sepharose-lysine and other conjugates. *Biochem. Biophys. Acta*, 1976, v. 421, p. 575-585.

Yu X.I., Fischer A.M. et al. Affinity chromatography of thrombin on modified polystyrene resins. *J. Chromat.*, 1986, v. 376, p. 429-435.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТРОМБИНА

(57) Изобретение относится к произ-

водству препаратов, а именно к способу получения тромбина, применяемого в биорганической химии. Цель изобретения - увеличение выхода и активности целевого продукта. Согласно предлагаемому способу получение тромбина из активированной протромбиновой сыворотки крови проводят методом аффинной хроматографии на аминоксидоагарозе, модифицированной карбобензоксипроизводными дипептидов D-фенилаланил-D-аргинина или D-аргинил-D-фенилаланина, осуществляя адсорбцию белков из 0,05 М трис-буфера в присутствии 0,1 М NaCl при pH 7,9-8,10 промывая колонку 0,5 М раствором NaCl и вымывая адсорбированный тромбин из колонки совместными линейными градиентами хлористого натрия от 0,5 до 1,0 М и изопропилового спирта от 0 до 50% при pH 7,9-8,1. 2 табл., 1 ил.

Изобретение относится к производству ферментных препаратов, а именно к способу получения тромбина, применяемого в биорганической химии.

Целью изобретения является увеличение выхода и удельной активности целевого продукта.

Согласно предлагаемому способу получения тромбина из активированной протромбиновой фракции сыворотки крови, включающему центрифугирование и аффинную хроматографию, аффинную хроматографию проводят на аминоксидоагарозе, модифицированной карбобензо-

ксипроизводными дипептидов D-фенилаланил-D-аргинина или D-аргинил-D-фенилаланина, осуществляя адсорбцию белков из 0,05 М трис-буфера и в присутствии 0,1 М NaCl при pH 7,9-8,1, промывая колонку 0,5 М раствором NaCl и вымывая адсорбированный тромбин из колонки совместными линейными градиентами хлористого натрия 0,5-1,0 М и изопропилового спирта 0-50% при pH 7,9-8,1.

Сущность предлагаемого способа заключается в применении в качестве аффинного лиганда карбобензоксипро-

(19) **SU** (11) **1527261** **A1**

изводных дипептидов, полученных из D-фенилаланина и D-аргинина. На аффинном сорбенте, синтезированном из аминогексилагарозы и названных пептидов, тромбин адсорбируется существенно сильнее примесей, которые можно вымывать из колонки до десорбции тромбина. Тромбин вымывается в совместных градиентах хлористого натрия и изопропилового спирта.

Пример 1. Синтез аффинных колонок 20 г аминогексилагарозы (приблизительно 65 мл геля) промывают на стеклянном фильтре последовательно водой (400 мл), 0,1 М раствором Na_2CO_3 (200 мл), водой (200 мл), переводят в диметилсульфоксид (ДМСО). Для этого гель промывают последовательно 26-, 50-, 75- и 100%-ными растворами ДМСО по 200 мл. Применяют ДМСО, который выдерживают в течение суток над гранулами КОН и перегоняют под уменьшенным давлением над гранулами КОН, 4 г карбобензоксипроизводного дипептидов D-фенилаланил-D-аргинина или D-аргинил-D-фенилаланина растворяют в 60 мл ДМСО. В полученном растворе суспендируют аминогексилагарозу и прибавляют 4 г дициклогексилкарбодиамида. Продолжительность проведения реакции при постоянном перемешивании на качалке при комнатной температуре 15 ч. Полученный сорбент промывают на стеклянном фильтре последовательно ДМСО, этанолом, 50%-ным этанолом и водой (каждого по 300 мл).

Пример 2. Соответственно примеру 1 синтезируют аффинные сорбенты со следующими лигандами: карбобензоксид-D-фенилаланил-D-аргинин и карбобензоксид-D-аргинил-D-фенилаланин. Полученными сорбентами заполняют колонки размерами 1,5x30 см, которые уравнивают 0,05 М и трис-HCl с 0,1 М NaCl.

Протромбин получают из плазмы донорской крови исходным из III фракций по Кону. Протромбин активируют добавлением суспензии тромопластина в присутствии CaCl_2 при 37°C в течение 30 мин, pH 7,4. Затем нерастворимую часть отделяют на ультрацентрифуге УАС-25 при 15000 об/мин в течение 20 мин. Полученный раствор диализуют против 0,05 М и трис-HCl с 0,1 М NaCl, pH 8,0 и наносят на колонку. После нанесения пробы колонку промывают 0,05 М и трис-HCl буфером, содержа-

щим 0,5 М NaCl, pH 8,0. Адсорбированный тромбин вымывают из колонок с совместными градиентами хлористого натрия (0,5-1,0 М) и изопропилового спирта (0-50%) на 100 мл 0,05 М трис-HCl с 0,5 М NaCl, pH 8,0 и 100 мл 0,05 М трис-HCl с 1,0 М NaCl в 50%-ном изопропиловом спирте, pH 8,0. Собирают фракции по 6 мл. Активность тромбина в первоначальном растворе и во фракциях определяют по скорости свертывания 0,1%-ного раствора фибриногена под действием фермента. В 1 мл раствора фибриногена в 0,001 М трис-HCl буфере с 0,15 М NaCl, pH 7,4 добавляют 20 мкл исследуемого раствора тромбина и определяют время свертывания.

На чертеже показана калибровочная кривая активности тромбина, которая построена по данным, полученным тромбином с известной активностью.

Фракции, содержащие тромбин, объединяют и определяют оптическую плотность при 280 нм и ферментативную активность. Полученные результаты представлены в табл. 1 (объем наносимой пробы 50 мл). При расчете содержания тромбина в миллиграммах учитывают, что его 1%-ный раствор имеет при 280 нм оптическую плотность 18,7.

Из табл. 1 видно, что при проведении аффинной хроматографии при комнатной температуре происходит некоторое уменьшение выхода по активности и получаемые препараты тромбина менее активны. Однако их активность превышает активность известных препаратов.

Пример 3. Колонку с размерами 1,2x13 см заполняют аффинным сорбентом, синтезированным по примеру 1 и имеющим в качестве пептидного лиганда карбобензоксид-D-аргинил-D-фенилаланин. Колонку уравнивают 0,05 М и трис-HCl буфером с 0,1 М NaCl. pH растворов уравнивания, нанесения пробы и вымывания адсорбированных веществ изменяют в пределах 7,2-8,5. Все операции проводят при комнатной температуре. Перед нанесением пробы из раствора удаляют осадок центрифугированием. Порядок нанесения пробы и элюирования не отличаются от приведенного в примере 2. Объем пика тромбина 24 мл. Результа-

ты разделения представлены в табл.2 (очистка тромбина на аффинной колонке с карбобензоксиг-D-аргинил-D-аланина-агарозой, объем наносимой пробы 15 мл, исходная активность 2600 N.I.H ед./мл, $D_{280} = 9,00$).

Из приведенных в табл.2 данных видно, что предлагаемая аффинная колонка позволяет получить высокоактивный препарат тромбина с хорошим выходом лишь в узком интервале pH.

Предлагаемый способ позволяет получать в одну стадию с выходом 90-99% препарат тромбина с удельной активностью до 6000 N.I.H ед./мг.

Сорбенты, используемые при предлагаемом способе, обеспечивают достаточно высокий выход фермента. Ранее для получения тромбина эти сорбенты не использовались.

Предлагаемый способ технологичен, сорбенты можно использовать многократно. Их сорбционные свойства восстанавливаются после промывания колонки градиентом изопропилового спирта от 50 до 0%.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения тромбина из активированной протромбиновой фракции сыворотки крови путем аффинной хроматографии, проводя нанесение пробы в 0,05 М трис-HCl буфере, содержащем 0,1 М NaCl, с последующей элюцией тромбина, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода и активности целевого продукта, аффинную хроматографию осуществляют при pH 7,9-8,1 на аминогексил-агарозе, модифицированной карбобензоксипроизводными дипептидов D-фенил-аланил-D-аргинина или D-аргинил-D-фенилаланина, проведением после нанесения пробы отмывки сорбента с одновременным удалением балластных белков 0,05 М трис-HCl буфером, содержащем 0,5 М NaCl, осуществлением элюции тромбина тем же буфером с совместными линейными градиентами хлористого натрия 0,5-1,0 М и изопропилового спирта 0-50%.

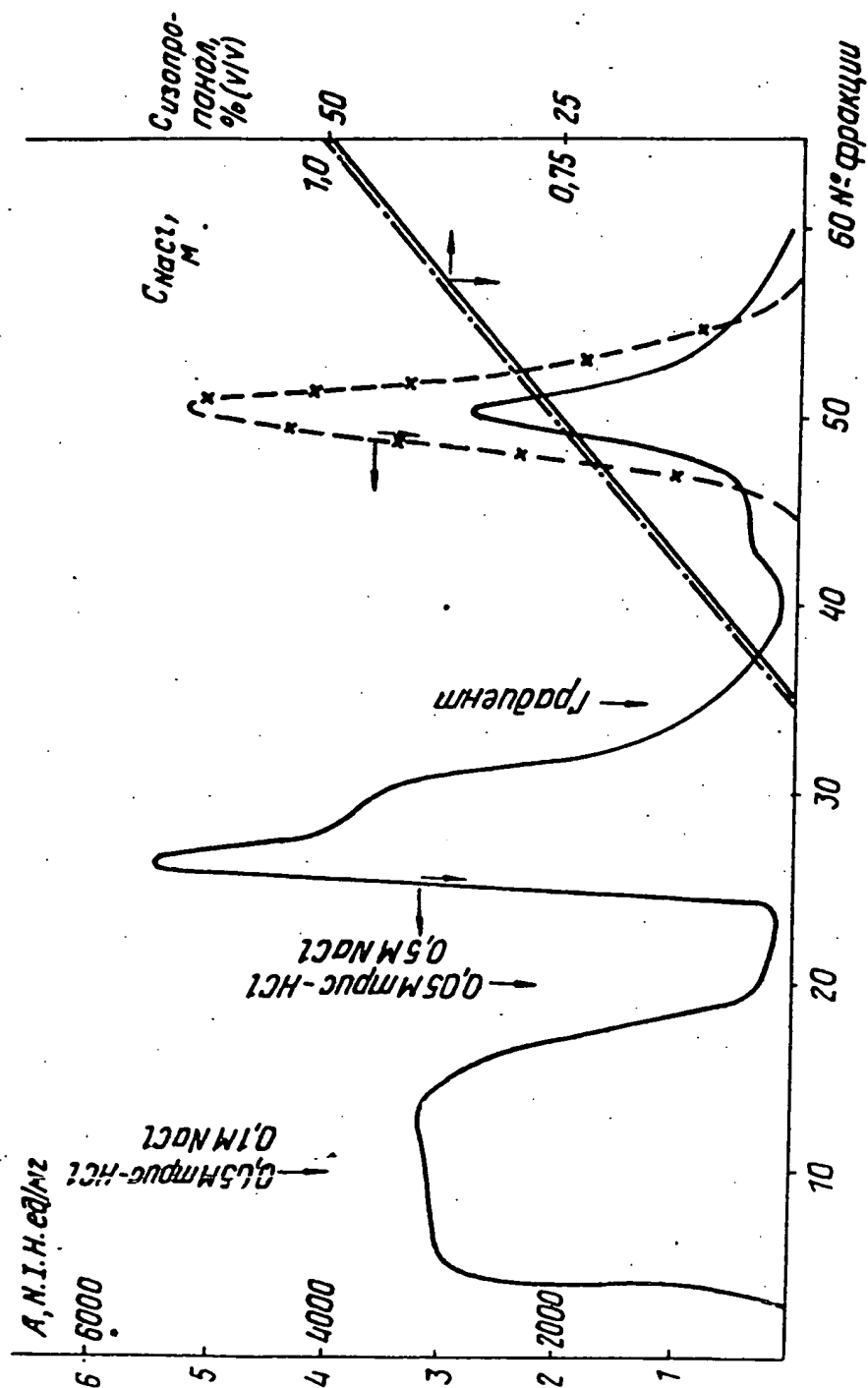
Т а б л и ц а 1

Лиганд на сорбенте	Температура разделения, °C	Исходная активность, N.I.H ед./мг	Активность тромбина после хроматографии N.I.H, ед./мг		Выход по активности, %
			Средняя по пику	Максимальная	
Kbz-D-Phe-D-Arg	4	283	4100	6000	99
	22	208	3050	5100	88
Kbz-D-Arg-D-Phe	22	283	3300	5000	90

Т а б л и ц а 2

pH разделения	Активность тромбина после хроматографии, N.I.H. ед./мг	Выход по активности, %
7,2	2000	64
7,8	2650	78
8,0	3250	90
8,2	2650	78
8,5	2250	72

1527261



Составитель А. Карякин
 Редактор О. Яковецкая Техред М. Дидык Корректор М. Васильева

Заказ 7481/34 Тираж 501 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101